



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—

代替 GB/T18641-2002

伪狂犬病检疫规程

Diagnostic techniques for Pseudorabies

(征求意见稿)

(本稿完成日期：20170830)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准依据 GB/T 1.1-2009 的规则起草。

本标准替代 GB/T 18641-2002《伪狂犬病诊断技术》。在文字段落顺序和编辑上做了改进，使规程语言更加顺畅；在保留原有检疫技术上，新增加的技术有：

——在聚合酶链式反应部分，增加了特异检测伪狂犬病野毒的gE-PCR方法。

——在抗体检测试验部分，保留了酶联免疫吸附试验的内容；采用了NY/T 678-2003《猪伪狂犬病免疫酶试验方法》中第2章的内容，用于检测猪伪狂犬病gE野毒抗体；新增了检测猪伪狂犬病gB抗体的竞争ELISA，为不同检验单位提供多种检测方法。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC 181）归口。

本标准起草单位：华中农业大学动物医学院，中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：何启盖，库旭钢，吴斌，陈品，李晓成，孟宪荣，范盛先，刘正飞，吴美洲，陈焕春。

引 言

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR; Aujeszky's disease, AD) 是由伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 引起的一种多种动物共患传染病, 可危害猪、牛、羊、犬、猫、家兔、小鼠、狐狸和浣熊等家畜、宠物、实验动物和野生动物。本病呈世界性分布, 养猪业受其影响最为严重。病毒感染后, 妊娠母猪出现流产、产死胎和木乃伊胎; 15日龄内仔猪出现神经症状, 致死率100%; 断奶仔猪出现神经症状和呼吸道症状, 致死率10%~20%; 育肥猪表现为呼吸道症状, 增重缓慢、饲料报酬低; 种母猪发生返情和空怀, 屡配不育; 公猪出现睾丸炎性肿胀或萎缩, 失去种用能力。除猪外的其他动物感染伪狂犬病毒后, 出现发热、奇痒和脑脊髓炎等临床症状, 最终死亡, 但呈散发形式。

本标准规定的血清学技术可用于非免疫动物的诊断、血清流行病学调查和免疫动物抗体检测。其中, 中和试验敏感性低但特异性强, 是国际通用的法定方法, 用于口岸进出口检疫; 乳胶凝集试验简便快速、敏感性高, 适用于基层单位对该病的现场筛查和检测; 酶联免疫吸附试验适用于实验室开展大批样品检测、产地检疫、流行病学调查, 尤其是gE鉴别诊断ELISA, 可区分基因缺失疫苗免疫猪和自然感染猪, 从而做出是否有野毒感染的诊断。

本标准规定的病原学诊断方法用于死亡动物病料和流产胎儿组织、活体动物的扁桃体、鼻拭子和公猪精液伪狂犬病毒的检测。其中, 病毒分离鉴定限于有条件的实验室使用, 聚合酶链式反应具有快速和灵敏的特点, 可同时检测大批样品。动物接种试验需在有隔离消毒条件的场所进行。

在修订本标准中, 我们参考了《OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2012年版, CHAPTER 2.1.2), 等效采用了其中伪狂犬病的检测技术, 完全与国际接轨。标准综合了国内外最新的技术进展, 也体现了技术成熟性。

伪狂犬病检疫规程

1 范围

本标准规定了伪狂犬病的血清中和试验、乳胶凝集试验、酶联免疫吸附试验、猪伪狂犬病 gB-ELISA（竞争法）和 gE-ELISA（竞争法）等抗体检测方法以及病毒分离鉴定、聚合酶链式反应和动物接种试验等病毒检测方法。

本标准适用于猪、牛、羊、犬、猫及其它易感动物伪狂犬病的诊断、检疫、免疫抗体评估和流行病学调查等。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 678 猪伪狂犬病免疫酶试验方法

3 血清中和试验（采用固定病毒稀释血清法）

3.1 仪器

二氧化碳培养箱，生物安全柜，微量移液器。

3.2 耗材

细胞培养瓶，96 孔细胞培养板，吸管，移液器枪头。

3.3 试剂

DMEM 培养液（附录 A1）和 0.25%胰酶（附录 A2）（规范性附录），PK-15 细胞，伪狂犬病阳性血清、阴性血清，伪狂犬病毒（野毒株）。

3.4 操作步骤

3.4.1 病毒半数细胞培养感染量（TCID₅₀）的测定

3.4.1.1 病毒培养和收获

将伪狂犬病毒（野毒株）接种于长成单层的 PK-15 细胞，接种量为液体培养基的 1/10 体积，37 ℃ 培养，待出现病变后，将细胞培养物冻融，离心去除细胞碎片，收获病毒。

3.4.1.2 病毒效价测定

3.4.1.2.1 用 DMEM 培养液将伪狂犬病毒作连续 10 倍稀释，即 10⁻¹、10⁻² ~10⁻⁹，每个稀释度取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中。

3.4.1.2.2 随后每孔加入 100 μL 经 0.25% 胰酶消化的 PK-15 细胞悬液(细胞含量以 10^5 个/mL 左右为宜)。

3.4.1.2.3 每个病毒稀释度作 8 个重复, 设正常细胞培养对照。

3.4.1.2.4 细胞 96 孔板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

3.4.1.2.5 逐日观察接毒细胞的病变, 观察 4~5 d, 记录每个稀释度接种细胞的细胞病变 (CPE) 孔数。在观察期内, 未接种病毒的细胞应无 CPE。

3.4.1.3 TCID_{50} 计算: 按照 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID_{50} (附录 C) (规范性附录)。

3.4.2 中和试验

3.4.2.1 血清灭活

将待检血清 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

3.4.2.2 血清稀释

在细胞培养板各孔中加入 50 μL DMEM 培养液, 随后在第 1 孔中加入待检血清 50 μL 混合后, 用微量移液器取出 50 μL 加至第 2 孔中, 混匀后再取出 50 μL 加至第 3 孔中, 依此类推, 直至第 10 孔 (将混合液弃去 50 μL), 血清稀释度即为 1:2, 1:4, 1:8~1:1024, 每份待检血清稀释度作 4 个重复。

3.4.2.3 加入病毒

将 50 μL 含 200 个 TCID_{50} 的病毒液加到不同稀释度的血清孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。

3.4.2.4 接种细胞

每孔中加入 100 μL 经 0.25% 胰酶溶液消化分散的 PK-15 细胞悬液 (细胞含量以 10^5 个/mL 左右为宜), 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

3.4.2.5 设立对照组

3.4.2.5.1 病毒对照组

每次试验中设立病毒对照。将 50 μL 200 TCID_{50} 病毒液作 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍稀释。每孔加入 100 μL 不同稀释度的病毒液和 100 μL PK-15 细胞悬液。每个稀释度 4 个重复。

3.4.2.5.2 血清对照组

用已知中和效价的阳性血清、阴性血清与相同滴度的病毒孵化后, 接种 PK-15 细胞; 同时设正常培养的细胞对照。

3.4.2.5.6 结果观察

逐日观察，记录病变和非病变的孔数，共观察 7d。1 000 倍稀释病毒对照组不引起细胞病变，而 1 倍稀释病毒对照组引起细胞病变，阳性血清、阴性血清、待检血清和正常细胞对照成立，测定结果有效，否则该试验不能成立。

3.4.2.5.7 结果判定

以CPE达到50%的血清最大稀释度作为抗体中和效价。如血清中和效价 $\geq 1:2$ ，判定为伪狂犬病抗体阳性。

4 乳胶凝集试验

4.1 仪器

微量移液器。

4.2 耗材

移液器吸头，洁净干燥玻片，洁净牙签。

4.3 试剂

伪狂犬病毒乳胶凝集抗原，伪狂犬病阳性和阴性血清，稀释液（附录B6）（规范性附录）。

4.4 操作步骤

4.4.1 对照试验

取等量的乳胶凝集试验抗原（约 20 μL ）分别与阴性血清、阳性血清在洁净的玻片上混合，混合液直径以不超过 1 cm 为宜。如阴性血清与抗原混合后不出现凝集，而阳性血清与抗原混合后出现相当于或高于 50%凝集，则对照试验成立。

4.4.2 待检血清处理

待检血清不必经热灭活或其他方式的灭活，但必须清亮透明，无溶血。

4.4.3 待检血清的检测

将待检血清用稀释液倍比稀释后，各稀释度取 15~20 μL 与等量胶乳凝集抗原在洁净干燥的玻片上用牙签搅拌充分混合，混合液直径以不超过 1 cm 为宜。结果在 1~3 min 内观察。

4.4.4 判定标准

100%凝集程度：混合液透亮，凝集颗粒聚集在液滴的边缘；75%凝集程度：混合液透明，出现大的凝集颗粒；50%凝集程度：混合液略浑浊，凝集颗粒较细；25%凝集程度：混合液浑浊，有少量凝集颗粒。不凝集：待检血清与抗原混合后，呈浑浊状态，无可见凝集颗粒。

4.4.5 结果判定

4.4.5.1 血清与抗原混合后，如出现 50%凝集程度，判为该稀释度伪狂犬病抗体阳性，否则判为抗体阴性。以出现 50%凝集程度的血清最高稀释倍数为该血清的抗体效价。

4.4.5.2 本方法检测感染或免疫后产生的早期抗体 IgM，当 IgM 消失后，本方法检测为阴性。此时，可用血清中和试验或酶联免疫吸附试验检测，可能出现以下三种结果之一：

4.4.5.2.1 如任何一种方法为阴性，判为伪狂犬病抗体阴性；

4.4.5.2.2 如任何一种方法为可疑，建议在间隔 2 周后再用中和试验或 ELISA 检测，如这两种方法均为阴性或可疑，判为阴性；

4.4.5.2.3 如中和试验和酶联免疫吸附试验均为阳性或某一种方法为阳性，判为伪狂犬病抗体阳性。

5 酶联免疫吸附试验

本试验包含用于检测伪狂犬病抗体（间接法）和猪伪狂犬病 gB 抗体（竞争法）、猪伪狂犬病 gE 抗体（竞争法）鉴别诊断 ELISA 方法，其中后两种竞争 ELISA 方法只能用于猪血清抗体检测，其他动物没有判定标准。

5.1 酶联免疫吸附试验

5.1.1 仪器设备

酶标仪，恒温反应箱，微量移液器。

5.1.2 耗材

酶标板，移液器吸头，实验用水（本标准所用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格）。

5.1.3 试剂

抗原，酶标抗体，阴性血清，阳性血清，待检血清，抗原包被液、封闭液、洗涤液、底物（TMB）溶液、终止液配制方法见附录 B（标准性附录）。

5.1.4 操作步骤

5.1.4.1 包被

用包被液将抗原稀释到工作浓度加入酶标板孔内，每孔 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1h 后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

5.1.4.2 洗涤

弃去孔内液体，用洗涤液洗 3 次，每次 3min，用吸水纸拍干。

5.1.4.3 封闭

各孔加入封闭液 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1h。按 5.1.2.2 步骤洗涤。

5.1.4.4 加入待检血清和阴性、阳性血清对照

待检血清经56 °C灭活后，用稀释液做1:40倍稀释，加入抗原孔中，每孔100μL；同时将阴性血清对照和阳性血清对照各加入三个抗原孔中，分别标记为A1、A2、A3和A4、A5、A6孔。37 °C作用1h，重复5.1.4.2步骤。

5.1.4.5 加入酶标抗体

用样品稀释液将酶标抗体按工作浓度稀释，每孔加入100μL，37 °C作用1h，重复5.1.2.2步骤。

5.1.4.6 加入底物

每孔加入100μL四甲基联苯胺（TMB）溶液，室温避光显色25min。

5.1.4.7 终止反应

每孔加入50μL终止液终止反应。

5.1.4.8 读取吸光值（OD值）

酶标仪上用490nm波长测定光吸收值。

5.1.4.9 结果判定

血清检测值与阳性对照血清检测值之比（S/P）值按以下公式计算：

$$S/P = \frac{\text{样品}A_{490} - NC_X}{PC_X - NC_X}$$

其中 $NC_X = (A_1OD_{490} + A_2OD_{490} + A_3OD_{490}) / 3$ 和 $PC_X = (A_4OD_{490} + A_5OD_{490} + A_6OD_{490}) / 3$ 。

5.1.4.9.1 如果 $S/P \geq 0.5$ ，则判为抗体阳性；

5.1.4.9.2 如果 $S/P < 0.5$ ，则判为抗体阴性。

5.2 猪伪狂犬病 gB-ELISA（竞争法）

5.2.1 仪器

酶标仪，恒温反应箱，微量移液器。

5.2.2 耗材

酶标板，移液器吸头，实验用水（本标准所用水应符合GB/T 6682中二级水的规格）。

5.2.3 试剂

猪伪狂犬病毒为抗原的包被板，辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗猪伪狂犬病病毒gE单克隆抗体，阴性血清，阳性血清，待检血清，四甲基联苯胺（TMB）底物溶液、洗涤液、终止液配制方法见附录B（标准性附录）。

5.2.4 操作步骤：

5.2.4.1 稀释待检血清

用样品稀释液将待检血清、阴、阳性对照作 1:1 倍稀释（即 100 μL 血清加 100 μL 的稀释液），其中阴、阳性对照各做 2 个重复。

5.2.4.2 血清孵育

将稀释血清 100 μL 加入抗原孔中，18~25 $^{\circ}\text{C}$ 作用 60 min (± 5 min)。

5.2.4.3 洗涤

甩掉板孔中的溶液，每孔加 300 μL 洗涤液，洗涤 3 次。

5.2.4.4 加入酶标抗体

加入辣根过氧化物标记的抗猪伪狂犬病毒 gB 单抗，室温（18~26 $^{\circ}\text{C}$ ）作用 20 min (± 1 min)，洗涤 3 次。

5.2.4.5 加入底物

每孔加入 100 μL TMB 底物，室温避光孵化 15 min (± 1 min)。

5.2.4.6 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液，终止反应。

5.2.4.7 读取吸光值

酶标仪上用 650nm 波长测定光吸收值。

5.2.4.8 结果判定

血清检测值与阴性对照血清检测值之比（S/N）值按以下公式计算：

$$S/N = \frac{\text{样品}A_{650}}{NC_X}$$

对照组中，阴性血清平均OD值减去阳性血清平均OD值的差大于0.30时，试验有效。

其中 $NC_X = (A_1OD_{650} + A_2OD_{650}) / 2$ 和 $PC_X = (A_3OD_{650} + A_4OD_{650}) / 2$ 。

5.2.4.8.1 当 $S/N > 0.70$ 时，判为猪伪狂犬病（gB）抗体阴性；

5.2.4.8.2 当 $S/N < 0.60$ 时，判为猪伪狂犬病（gB）抗体阳性；

5.2.4.8.3 当 S/N 值为0.60~0.70时，判为猪伪狂犬病（gB）抗体可疑。

5.3 猪伪狂犬病gE-ELISA（竞争法）

按照 NY/T 678-2003《猪伪狂犬病免疫酶试验方法》中的操作方法进行。

6 病毒分离鉴定

6.1 仪器

高速冷冻离心机，组织匀浆机（或研钵），生物安全柜，微量移液器。

6.2 耗材

直径为0.22 μm滤器，细胞培养瓶，吸管，移液器吸头。

6.3 试剂

DMEM培养基和0.25%胰酶溶液（附录A），仓鼠肾细胞（BHK-21）或猪肾细胞系（PK-15）细胞，犊牛血清，青霉素，链霉素。

6.4 操作步骤

6.4.1 病料采集

对死亡病畜或活体送检处死的动物，采集大脑（尤其含有三叉神经节）、扁桃体等组织，4~8 °C冷藏条件下运输送检。

6.4.2 样品处理

待检组织匀浆后与DMEM制成1:5乳剂，-80 °C反复冻融3次，5 000 rpm离心30 min后，取上清液经0.22 μm滤器过滤，加入青霉素溶液至终浓度为300 IU/mL、链霉素为100 μg/mL，-80 °C保存作为接种材料。

6.4.3 病料接种

将病料滤液接种已长成单层的BHK-21细胞（或PK-15细胞），接种量为所加培养液量的1/10，37 °C恒温箱中吸附1 h，加入含10%犊牛血清（无支原体，预先经56 °C水浴灭活30 min后过滤除菌）的DMEM培养液，置37 °C CO₂培养箱中培养，逐日观察病变。

6.4.4 观察结果

接种后36~72 h，如细胞出现细胞变圆、拉网、脱落等典型的细胞病变效应，可初步判定病料中含有伪狂犬病毒（阳性）。如第一次接种未出现细胞病变，应将细胞培养物冻融后盲传3代，如仍无细胞病变，则判为病料中无伪狂犬病毒（阴性）。

6.4.5 病毒鉴定

将出现细胞病变的细胞培养物，用阳性血清做病毒中和试验（3.2.2）或聚合酶链式反应（7）或动物感染试验（8）作进一步鉴定。

7 聚合酶链式反应

7.1 仪器

生物安全柜，PCR仪和凝胶成像系统，组织匀浆机（或研钵），高速冷冻离心机，水浴锅，分析天平，微量移液器。

7.2 耗材

琼脂糖，移液器吸头，EP管，PCR管。

7.3 试剂

DNA 提取试剂盒，TEN 缓冲液（附录 A.3）、溴化乙锭（EB）（附录 A.4）（标准性附录）或新型核酸染料（EB 替代物）。

7.4 引物

7.4.1 伪狂犬病毒 gD 基因检测：

扩增伪狂犬病毒 gD 基因 434-651nt 间的基因片段，扩增产物大小约为 217bp。引物序列：上游引物 P1：5'-CAGGAGGACGAGCTGGGGCT-3'，下游引物 P2：5'-GTCCACG CCCCCTTGAAGCT-3'。可用于检测伪狂犬病毒，但不能区分猪伪狂犬病基因缺失活疫苗和野毒株。

7.4.2 伪狂犬病毒 gE 基因检测：

扩增伪狂犬病毒 gE 基因 79-446nt 间的基因片段，扩增产物大小约为 368bp。引物序列：上游引物 P3：5'-TTTGGATCCATGCGGCCCTTTCTG-3'，下游引物 P4：5'-TTTGAATTCTTACGACACGGCGTCGCA-3'，可用于区分猪伪狂犬病基因缺失活疫苗和野毒株。

7.5 操作步骤

7.5.1 样品的采集

对于病死或扑杀动物，取大脑（含三叉神经节）、扁桃体等组织；对于待检活猪，用灭菌棉签伸入猪鼻腔中（以棉签棉花部分全部插入鼻腔为准），同一方向转动 3~4 次，沾取鼻粘液，即为鼻拭子；用扁桃体取样器采集成年种猪扁桃体；采集公猪精液（检测前需用灭菌 PBS 做 10 倍稀释）。4~8 °C 冷藏条件下送到实验室检测。

7.5.2 样品处理与模板制备

组织病料用组织研磨器或匀浆器研磨后，按 1:5 比例用 TEN 缓冲液（附录 A.3）充分混悬，收集于离心管内，反复冻融 3 次，8 000 rpm 离心 5 min；鼻拭子样品，则加入 2mL TEN 缓冲液涡旋 10 min 后挤压棉签，混悬液 8 000 rpm 离心 5min，取上清。精液样品，先用 PBS 做 10 倍稀释，方可用于模板制备。

取组织或鼻拭子样品的上清液或稀释好的精液，按 DNA 试剂盒说明书操作步骤，提取 DNA 模板，-20 °C 贮存备用。

7.5.3 聚合酶链式反应(PCR)的操作程序

7.5.3.1 伪狂犬病 gD 基因 PCR 反应体系：

总体积 25 μ L，MIX 12.5 μ L，引物 P1、P2 各 1 μ L (10 μ M)，H₂O 5.5 μ L，DNA 模板 5 μ L。扩增条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 30 sec，65 °C 30 sec，72 °C 30 sec，35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。

7.5.3.2 伪狂犬病 gE 基因 PCR 反应体系：

总体积 25 μ L，MIX 12.5 μ L，引物 P3、P4 各 1 μ L (10 μ M)，H₂O 5.5 μ L，DNA 模板 5 μ L。扩增条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 30 sec，60 °C 30 sec，72 °C 30 sec，35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。

7.5.4 PCR 产物的检测与判定

将 8~10 μ L PCR 扩增产物加入含有溴化乙锭 (EB) 或新型核酸染料 (作为 EB 替代物) 的 1% 琼脂糖凝胶的各电泳孔中 (设阳性和阴性样品扩增对照孔)，电泳后，在凝胶成像系统或紫外光下观察结果。

7.5.4.1 如出现大小约 217bp 的扩增产物，可判定为伪狂犬病毒阳性，但不能区分疫苗毒株和野毒株。

7.5.4.2 当阳性对照样品和被检样品均出现大小约 368bp，可判定被检样品为伪狂犬病毒野毒阳性。如不出现该扩增产物，但满足 7.5.4.1 中的阳性结果，判定被检样品为 gE 基因缺失疫苗毒株，否则，判为扩增反应失败。

8 动物感染试验

本试验要求在有良好隔离条件和消毒措施的动物房实施，试验结束后对场地和用具实施彻底消毒。

8.1 家兔接种试验 本法用于疑似伪狂犬病患病动物组织检测和分离病毒的鉴定。

8.1.1 家兔的选择

选择健康成年家兔 (至少 4 只)，用血清中和试验或胶乳凝集试验，证实为伪狂犬病病毒抗体阴性。

8.1.2 病料的采集、处理及接种

无菌采集扁桃体 (病猪) 或患病动物脑组织 (含三叉神经节)，用生理盐水或 PBS 液制成 20%~30% (W/V) 匀浆液，反复冻融 3 次后 5 000 rpm 离心 10 min，取 1~2 mL 上清液颈部皮下接种家兔 (2 只)；如接种物为疑似伪狂犬病病毒的细胞培养物，则取 1~2 mL，同样皮下接种家兔 (2 只)。同时设立接种等量生理盐水或 PBS 或培养基的对照家兔。

8.1.3 结果观察和判定

8.1.3.1 伪狂犬病毒阳性

接种后24~48 h，在家兔注射部位出现奇痒，表现为家兔舔（啃）咬注射局部，导致皮肤溃烂；呼吸困难、尖叫、四肢麻痹、痉挛等症状，病程2~5 d，最终死亡。对照家兔无任何临床症状，健活。可初步判定病料或细胞培养物中含有伪狂犬病毒。

8.1.3.2 伪狂犬病毒阴性

在接种后一周，病料悬液或细胞培养物接种家兔不出现任何症状，健活；同时，对照家兔无任何临床症状，健活。可判定病料（或细胞培养物）中不含伪狂犬病毒。

9 综合判定

仅当本规程中5.3结果阳性，可判定为猪伪狂犬病野毒感染抗体阳性；当7.3.4.2结果为阳性，可判定为伪狂犬病野毒病原阳性。其余各项检测结果为阳性，可判断为伪狂犬病毒感染阳性，但无法区分是疫苗毒株还是野毒株所致。

附录 A

(规范性附录)

细胞培养和 PCR 反应常用溶液制备

A.1 DMEM培养液的制备:

DMEM配制方法如下:

A.1.1 量取去离子水950 mL, 置于一定的容器中;

A.1.2 将DMEM粉剂10 g加于15~30 °C的去离子水中, 边加边搅拌;

A.1.3 每1 000 mL培养液加3.7 g碳酸氢钠 (NaHCO₃);

A.1.4 加水至1 000 mL, 用1 mol/L NaOH或HCl将培养液pH值调至6.9~7.0, 在过滤前应盖紧容器瓶塞;

A.1.5 立即用孔径为0.22 μm的微孔滤膜正压过滤除菌。4 °C冰箱保存备用。

A.2 0.25%胰酶溶液的制备:

0.25%胰酶溶液制备方法如下:

胰蛋白酶250 mg加入100 mL Hanks液中, 充分溶解后, 经直径0.22 μm滤器过滤除菌, -20 °C保存。

A.3 TEN缓冲液的制备:

TEN缓冲液的制备方法如下:

三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (Tris-HCl) (pH8.0)	1 210.00 mg (10 mmol/L)
乙二胺四乙酸 (EDTA) (pH8.0)	372.00 mg (1.0 mmol/L)
三蒸水	1 000 mL

A.4 溴化乙锭溶液的制备:

溴化乙锭溶液的制备方法如下:

溴化乙锭	1.0 g
三蒸水	100 mL

用磁力搅拌器搅拌数小时以确保其溶解, 然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中, 室温保存。

注: 溴化乙锭是强诱变剂, 并有中度毒性, 使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套, 称量染料时要戴面罩。建议采用EB替代物作为本反应扩增产物的显色剂。

附录 B
(规范性附录)

酶联免疫吸附试验有关溶液的配制方法

B.1 洗涤液的制备:

洗涤液为含0.05%吐温-20 (Tween-20) pH7.4的磷酸盐缓冲液, 制备方法如下:

将下列试剂按顺序依次加至容积为1000mL容器中, 充分溶解即成。

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.9 g
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水至	1000 mL

B.2 抗原包被液的制备:

包被液为25 mmol/L、pH 9.6碳酸盐冲液, 制备方法如下:

碳酸钠 (Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	2.93 g
蒸馏水	1 000 mL

B.3 封闭液的制备:

在洗涤液100 mL中加入0.1 g牛血清白蛋白 (BSA) 即可。

B.4 底物溶液的制备:

B.4.1 1mol/L pH5.0磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液

将下列试剂按顺序依次加入1 000 mL体积的容器中, 充分溶解即成。

磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	71.6 g
柠檬酸	19.2g
蒸馏水	1 000 mL

50 mL 0.75% H₂O₂: 取30% H₂O₂ 1.25 mL, 加入蒸馏水, 使总体积达到50 mL。

TMB (四甲基联苯胺) 使用液: 取200 mg TMB溶解于100 mL无水乙醇中。-20 °C保存。

B.4.2 底物溶液 (临用时配制)

0.1 mol/L pH5.0磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液	9.5 mL
----------------------------	--------

TMB (2mg/mL无水乙醇)	0.5 mL
------------------	--------

0.75% H ₂ O ₂	42 μL
-------------------------------------	-------

此液对光敏感，应避免强光直射。现配现用。

B.5 终止液的制备：

终止液为2 mol/L 硫酸 (H₂SO₄)，制备方法如下：

硫酸 (H ₂ SO ₄)	22.2 mL
--------------------------------------	---------

蒸馏水	177.8 mL
-----	----------

B.6 样品稀释液的制备：

样品稀释液为0.1 mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液，制备方法如下：

将下列试剂按顺序依次加至容积为1000 mL的容器中：

氯化钠 (NaCl)	8.02 g
------------	--------

氯化钾 (KCl)	0.201 g
-----------	---------

磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	3.87 g
--	--------

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.163 g
--	---------

加蒸馏水至	1000 mL
-------	---------

混匀后，充分溶解，最后加入叠氮钠 (NaN₃) 防腐，其终浓度为万分之一。

附录 C
(资料性附录)

病毒半数细胞培养感染量TCID₅₀的计算 (按Reed-Muench法)

举例说明

C.1 接种后细胞病变累计的计算方法

见表C.1。

表C.1 接种后细胞病变累计的计算方法

病毒稀释度	细胞病变		累计孔数		细胞孔数	出现细胞病变百分比/%
	出现细胞病变孔数	不出现细胞病变孔数	出现细胞病变	不出现细胞病变		
10 ⁻¹	8	0	51	0	51	(51/51) 100
10 ⁻²	8	0	43	0	43	(43/43) 100
10 ⁻³	8	0	35	0	35	(35/35) 100
10 ⁻⁴	8	0	27	0	27	(27/27) 100
10 ⁻⁵	8	0	19	0	19	(19/19) 100
10 ⁻⁶	6	2	11	2	13	(11/13) 84.6
10 ⁻⁷	4	4	5	6	11	(5/11) 45.4
10 ⁻⁸	1	7	1	13	14	(1/14) 7.1
10 ⁻⁹	0	8	0	21	21	(0/21) 0

C.2 TCID₅₀计算方法:

TCID₅₀计算方法如下:

从表1可见该病毒的TCID₅₀在10⁻⁶ (84.600) 和10⁻⁷ (45.400) 之间, 首先按式 (E1) 计算距离比:

$$\text{距离比} = \frac{\text{高于50\%病变百分数} - 50}{\text{高于50\%病变百分数} - \text{低于50\%病变百分数}} \dots \dots (E1)$$

$-\lg\text{TCID}_{50} = \text{高于50\%稀释度对数} + \text{距离比} \times \text{稀释度对数}$

$$\text{代入公式: 距离比} = \frac{84.6 - 50}{84.6 - 45.4} = 0.88$$

$$-\lg\text{TCID}_{50} = -6 + 0.88 \times (-1) = -6.88$$

所以: $\text{TCID}_{50} = 10^{6.88} / 0.1 \text{ mL}$

说明: 由于病毒的稀释倍数是10⁻¹倍, 其稀释倍数的对数是(-1), 因此可将上式获得的距离比(0.88)加于引起细胞病变孔数高于细胞培养孔数50%的病毒稀释度的对数(6)上, 因此该病毒的TCID₅₀应是10^{6.88}/0.1 mL。

附录 D

(资料性附录)

伪狂犬病毒gD基因和gE基因的PCR扩增序列**D.1 伪狂犬病毒 PCR 目的 gD 基因 (217bp) 扩增产物 DNA 序列:**

CAGGAGGACGAGCTGGGGCTGCTCATGGTGGCCCCGGGGCGGTTCAACGAGGGCCAGTACCGGC
GCCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAACATCCTCACCGACTTCATGGTGGCGCTCCCCGAGGGGCAA
GAGTGCCCGTTTCGCCCCGCGTGGACCAGCACCGCACGTACAAGTTCGGCGCGTGCTGGAGCGACG
ACAGCTTCAAGCGGGGCGTGGACA

D.2 伪狂犬病毒 PCR 目的 gE 基因 (368bp) 扩增产物 DNA 序列:

CCATGCGGCCCTTTTTGCTGCGCGCCGCGCAGCTCCTGGCGCTGCTGGCCCTGGCGCTCTCCACCG
AGGCCCCGAGCCTCTCCGCCGAGACGACCCCGGGCCCCGTCACCGAGGTCCCGAGTCCCTCGGCC
GAGGTCTGGGACGACCTCTCCACCGAGGCCGACGACGATGACCTCAACGGCGACCTCGACGGCG
ACGACCGCCGCGCGGGCTTCGGCTCGGCCCTCGCATCCCTGAGGGAGGCGCCCCGGCCCATCTG
GTGAACGTGTCCGAGGGCGCCAACCTCACCTCGACGCGCGCGGCGACGGCGCCGTGCTGGCCG
GGATCTGGACGTTCTGCCCCGTCCGCGGCTGCGACCGGTGTCG
